

11209



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

9/5
20/

HOSPITAL GENERAL: "DR. MANUEL GEA GONZALEZ"
SECRETARIA DE SALUD

HORMONAS SEXUALES Y REGENERACION
HEPATICA EN MODELO MURINO

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
CIRUJANO GENERAL

P R E S E N T A :

DRA. ALICIA SIGLER *Moreno*

ASESOR DE TESIS: DR. JUAN MANUEL MIJARES GARCIA
JEFE DEL SERVICIO DE CIRUGIA GENERAL



MEXICO, D. F.,

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL


Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIONES

HOSPITAL GENERAL
"DR. MANUEL GEA GONZALEZ"

DIRECCION DE ENSEÑANZA
E INVESTIGACION


DR. CARLOS A. RIVERO LOPEZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

HOSPITAL GENERAL
DR. MANUEL GEA GONZALEZ

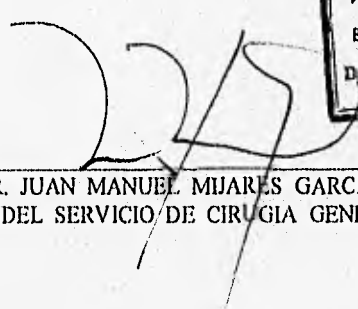
SUBDIRECCION
DE INVESTIGACION


DRA. DOLORES SAAVEDRA ONTIVEROS
SUBDIRECTORA DE INVESTIGACION

 FACULTAD
DE MEDICINA

☆ SET. 24 1996 ☆

SECRETARIA DE SERVICIOS
ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE POSGRADO
BRP


DR. JUAN MANUEL MIJARES GARCIA
JEFE DEL SERVICIO DE CIRUGIA GENERAL

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial la contribución a la realización de este trabajo por parte del Dr. Alfonso Carabez Trejo, Jefe del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la U. N. A. M., quien nos apoyó con los estudios histológicos y analizó las muestras para la obtención de los resultados y conclusiones que presentamos.

A mis padres y hermanos, por su gran cariño y apoyo incondicional.

A mi hijo Julio, por ser el motor y alegría de mi vida.

INDICE

	PAG.
ANTECEDENTES	1
MATERIAL Y METODO	6
RESULTADOS	7
DISCUSION	7
CONCLUSIONES	8
FIGURAS	9
BIBLIOGRAFIA	11

HORMONAS SEXUALES Y REGENERACION HEPATICA EN MODELO MURINO

ANTECEDENTES

Se sabe que el hígado es órgano blanco para muchos factores de crecimiento y hormonas que intervienen en su regeneración y en el desarrollo de neoplasias en su parénquima. Baum y cols, en 1973 (1) reportaron por primera vez la asociación de hepatomas benignos con la administración de anticonceptivos orales. Esto despertó el interés de varios investigadores quienes lo corroboraron y le dieron un enfoque terapéutico al demostrar que los adenomas hepáticos sufrían regresión al suspender las hormonas (2, 3). Por otro lado llama la atención la incidencia de hepatocarcinoma en pacientes cirróticos, en especial los que presentan ginecomastia y alteraciones en los niveles plasmáticos de estrógenos como estrona y estriol (4). También sus niveles de testosterona se encuentran por debajo de lo normal y existe un incremento en la relación estradiol/testosterona (5).

Nagasue y cols. (6), demostraron que la relación estrona/testosterona es mayor en los cirróticos con carcinoma hepatocelular que en aquellos sin neoplasia, por lo que se deduce que la hiperestrogenemia que se aprecia en ellos pudiera tener algún papel en la carcinogénesis del hígado. El mismo grupo de investigadores estudiaron 30 casos diagnosticados como hepatocarcinoma asociado a cirrosis hepática y encontraron que en 10 pacientes los títulos de receptores a estrógenos eran mayores en el tumor que en el resto del hígado, en otros 10 el resultado fué opuesto y en los 10 restantes los receptores se encontraban ausentes tanto en el tumor como en el resto del parénquima (7). Posteriormente estudiaron los receptores a andrógenos en 20 cirróticos con hepatocarcinoma y en el hígado de 5 varones sanos. Encontraron dichos receptores en el citoplasma de todos los hígados sanos y en 14 de los hígados enfermos, cuyos títulos eran mayores en el tejido tumoral que en el cirrótico que lo rodeaba, en otros 3 los receptores se detectaron en el hígado cirrótico pero no en el tumor y finalmente en los otros 3 los receptores fueron negativos tanto para el tumor como para el resto del parénquima cirrótico y supusieron que el hígado normal posee receptores a andrógenos los cuales pierde al desarrollar cirrosis, pero con el desarrollo del carcinoma los vuelve a manifestar. Concluyeron que probablemente los andrógenos tienen un papel en el crecimiento, desarrollo y carcinogénesis del hígado (8). Finalmente encontraron receptores a andrógenos en el 65% de los hígados de mujeres con cirrosis y en el 37% de los hepatocarcinomas que en ellos se desarrollaban; en esas mujeres con carcinomas y receptores a andrógenos positivos, los niveles fueron mayores en el tumor que en el resto del hígado (9).

Estos hallazgos han promovido la búsqueda de la hormonoterapia ideal contra el hepatocarcinoma (10). También se han propuesto dichos receptores como factores pronósticos; así, se observó que en los pacientes con hepatocarcinoma y receptores a andrógenos positivos, el índice de recurrencia fué de 67.9% después de la resección hepática y la sobrevida a 5 años de 17.3%; para los pacientes con receptores negativos, los porcentajes fueron 33.3% y 62.2% respectivamente (11). Además, se ha hecho una correlación clinicopatológica de acuerdo a la presencia de receptores a estrógenos en pacientes con hepatocarcinoma y el único dato substancial fué el hallazgo de tumores más grandes en los pacientes sin dichos receptores y por lo tanto la incidencia de resecciones hepáticas mayores fué más alta en este grupo. No existieron diferencias significativas en cuanto a los estudios histopatológicos, mortalidad operatoria, recurrencia o sobrevida a largo plazo (12).

Los factores que participan en la regeneración hepática se pueden dividir en:

- 1) Mitógenos completos
- 2) Inhibidores del crecimiento
- 3) Promotores del crecimiento.

1) MITOGENOS COMPLETOS

a) Factor de crecimiento epidérmico. Es el prototipo de estimulador mitótico en la mayoría de las células epiteliales. También promueve la síntesis de ADN en los hepatocitos, el transporte de aminoácidos y la síntesis de proteínas. Se produce en las glándulas de Brunner del duodeno y comparte con el factor transformador de crecimiento alfa el mismo receptor. Su acción mitogénica es inhibida por el factor transformador de crecimiento beta (13).

b) Factor transformador de crecimiento alfa. Es aún más potente que el anterior. Se produce por los hepatocitos en regeneración y sus niveles se elevan dentro de las 8 hr posteriores a una hepatectomía de dos tercios con un pico de expresión a las 24 hr y otra elevación menor a las 72 hr. Al parecer también tiene una función paracrina al estimular la proliferación de las células adyacentes no parenquimatosas (14).

c) Hepatopoiétina A (Factor de crecimiento de los hepatocitos). Es una proteína de 100,000 Kda, diez veces más potente que el factor de crecimiento epidérmico y además de su efecto mitogénico, promueve cambios morfológicos en los hepatocitos como aumento en su tamaño. Es inhibido por el factor transformador de crecimiento beta. Los tejidos que la producen son las neuronas del lóbulo occipital, ductos acinares de las glándulas salivales, células interfoliculares tiroideas, glándulas de Brunner del duodeno y porción exócrina del páncreas (15).

d) Hepatopoietina B. Glicolípido menor a 500 Da, menos activo que los mitógenos ya citados, pero actúa de manera sinérgica con ellos. Aún no se conoce su fuente de producción.

e) Sustancia estimuladora del hígado. Se extrae de hígados de neonatos y en regeneración. Su peso es de 16,000 kDa. Aumenta el efecto del factor de crecimiento epidérmico (16).

2) INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO

a) Factor transformador de crecimiento beta. Su peso molecular es de 26,000 kDa. Es producido por células no parenquimatosas hepáticas y se detecta a las 4 hr posthepatectomía, permanece en niveles bajos hasta las 18 - 20 hr en que se eleva rápidamente hasta las 72 hr. Permanece así por más de 96 hr (17).

b) Interleukina 1 beta. Inhibe la proliferación de los hepatocitos pero no de una manera completa como el factor antes mencionado. La interleukina 6 es otro inhibidor pero aún menos potente.

c) Inhibidor de la proliferación de hepatocitos. Proteína de 15,000 kDa que inhibe la proliferación de hepatocitos en cultivo.

3) FACTORES COMITOGÉNICOS

a) Norepinefrina. Favorece el efecto mitogénico del factor de crecimiento epidérmico. Por sí misma no es mitogénica para los hepatocitos y disminuye el efecto mito-inhibitorio del factor transformador de crecimiento beta sobre todo a las 12 - 16 hr posthepatectomía de dos tercios.

b) Vasopresina, angiotensina II y angiotensina III. Menos potentes que norepinefrina pero con la misma función de comitógenos.

c) Estrógenos. Se elevan después de una hepatectomía de 2/3 y alcanzan un pico a las 24 - 48 hr. De manera contraria, los niveles de testosterona disminuyen. El tamoxifén administrado después de la hepatectomía de 2/3 bloquea la síntesis hepática de ADN. Su función es la de favorecer el efecto del factor de crecimiento epidérmico. En estudios experimentales se ha demostrado que actúan como promotores de la hepatocarcinogénesis (18, 19).

d) Insulina y glucagon. Los hepatocitos en cultivo degeneran y mueren en ausencia de insulina. La pancreatomecía provoca disminuci3n del peso hepático. La administraci3n de insulina y glucagon revierten parcialmente esta atrofia. La pancreatomecía tambi3n se ha asociado con disminuci3n de la sntesis de ADN durante la regeneraci3n hepática. La administraci3n de insulina y glucagon revierte este efecto. Sin embargo no existe ninguna evidencia de que estas sustancias sean mit3genos para el hígado. Inclusive se ha querido encontrar utilidad terapéutica al administrar insulina y glucagon en falla hepática fulminante, lo que result3 en fracaso para estimular la regeneraci3n hepática (20, 21).

MARCO TEORICO

La regeneraci3n hepática es un proceso complejo que aú n se entiende en su totalidad. La interacci3n de varios factores, estimulantes e inhibidores, originados en el hígado o fuera de él, tiene como resultado la formaci3n de nuevo tejido hepático. En los últimos 20 años se han documentado experiencias en las que de modo probable se señala la intervenci3n de algunas hormonas sexuales en la reparaci3n del hígado. En Pittsburgh, el grupo de Starzl, Francavilla y cols. (22) estudi3 los niveles de estradiol y testosterona en el postoperatorio inmediato de 5 varones sometidos a hepatectomía del 40 - 60%. Al encontrar que los niveles de estradiol aumentan y los de testosterona se reducen señalaron la similitud con los hallazgos que ocurren en ratas macho sometidas a hepatectomía del 70%. Concluyeron que dichas hormonas pueden participar en el inicio o cuando menos modulan la respuesta regenerativa despu3s de una resecci3n hepática mayor.

Se han hecho varios estudios para describir los cambios histol3gicos que ocurren en el hígado de la rata en regeneraci3n despu3s de la hepatectomía. Anderson y cols. (23) encontraron que las ratas con hepatectomía de un l3bulo mostraron un pico de actividad mit3tica entre las 48 y 72 hr con un regreso a la normalidad al 4o. día postoperatorio. La actividad mit3tica en el grupo de hepatectomía de dos l3bulos fu3 de mayor magnitud, inici3 m3s temprano y el pico máx imo fu3 desde las 24 a las 72 hr. La actividad mit3tica fu3 normal a partir del 4o. día. Las ratas con hepatectomía subtotal mostraron una actividad mit3tica de mayor magnitud a las que se les reseco s3lo un l3bulo, pero comenz3 despu3s de las que se les realiz3 hepatectomía de dos l3bulos, con un pico máx imo a las 48 - 96 hr y un regreso a lo normal entre los días 6o. y 11o. postoperatorios.

Sus hallazgos ultraestructurales fueron los siguientes:

A las 12 hr posthepatectomía, el glucógeno disminuyó en las biopsias de todos los grupos. Los cuerpos lipídicos intracelulares y los fagolisosomas fueron prominentes en los grupos con hepatectomía de 2 lóbulos y subtotal mientras que fueron escasos en el otro grupo. El retículo endoplásmico rugoso fué normal en el grupo con hepatectomía de un sólo lóbulo, pero muy desorganizado y en forma de filamentos en los otros dos grupos. La degeneración mitodonerial se evidenció en algunas células de todos los grupos: edema, floculación de la matriz y distorsión del cristal. También se evidenció la formación de numerosos cuerpos de mielina.

A las 24 - 48 hr posthepatectomía, los cuerpos lipídicos fueron numerosos en los grupos con hepatectomía de dos lóbulos y subtotal. El retículo endoplásmico rugoso se incrementó en todos los grupos con una orientación perinuclear. Los ribosomas libres aumentaron en los tres grupos. Los fagolisosomas fueron más numerosos en los grupos con hepatectomía de dos lóbulos o subtotal.

A las 72 hr: Se obtubieron los mismos hallazgos pero más importantes en todos los grupos. Los cambios de regeneración presentes pero más pronunciados en las ratas con hepatectomía de dos lóbulos o subtotal: hepatocitos binucleados y núcleos multinucleolados, con un incremento de cuerpos de Golgi y retículo endoplásmico liso.

A las 96 hr: Restitución normal, a excepción de las ratas con hepatectomía subtotal, en las que los cambios permanecieron hasta el sexto día posthepatectomía.

El planteamiento del problema de nuestro estudio fué el siguiente:

¿Son las hormonas gonadales responsables de los cambios histológicos y ultraestructurales que ocurren después de la hepatectomía del 40% en ratas?

La justificación de este estudio se basa en la necesidad de conocer otras alternativas terapéuticas para padecimientos en los que el daño hepático es importante, la regeneración es vital y el trasplante se encuentre contraindicado o no pueda ser realizado por limitaciones económicas como las existentes en nuestro país.

El objetivo de este trabajo es comparar en ratas sometidas a resección hepática del 40%, con o sin castración, si existen diferencias histológicas y ultraestructurales en el hígado.

Nuestra hipótesis fué:

Si las hormonas gonadales promueven la regeneración hepática y al castrar a las ratas se suspende su producción, entonces dicha regeneración será menor cuando se lleve a cabo la hepatectomía parcial con ooforectomía u orquiectomía.

DISEÑO

Se trata de un estudio comparativo, ciego, experimental, prospectivo y transversal.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 32 ratas Wistar machos y hembras, de 150 a 200 g de peso, alimentadas ad libitum, sin ninguna enfermedad cardiopulmonar o abdominal, las cuales fueron distribuidas de manera aleatoria en cuatro grupos:

- A) 8 hembras con hepatectomía del 40%
 - B) 8 hembras con hepatectomía del 40% y ooforectomía
 - C) 8 machos con hepatectomía del 40%
 - D) 8 machos con hepatectomía del 40% y orquiectomía
- A es el grupo control para B y C para D.

CRITERIOS DE SELECCION

Criterios de inclusión: ratas Wistar machos y hembras con peso de 150 a 200 g, en buen estado de salud, alimentadas ad libitum.

Criterios de exclusión: ratas sin el peso requerido, con enfermedad cardiopulmonar y/o abdominal en el momento de la cirugía.

Criterios de eliminación: isquemia o necrosis hepática durante o después de la cirugía, enfermedad cardiopulmonar y/o abdominal en el momento de la toma de biopsias.

VARIABLES

DEPENDIENTES: El tejido hepático que se reseca y lóbulos ressecados. El momento de la ooforectomía u orquiectomía después de la hepatectomía del 40%. Momento de la toma de biopsias. Cantidad de tejido hepático para las biopsias y técnica de obtención de las mismas. Manera de tratar la muestra para ser analizada por microscopía fotónica y electrónica.

INDEPENDIENTES: Alimentación, estado nutricional y de salud de las ratas.

Mediante microscopía fotónica se analizó la regeneración hepática en una escala nominal en cuanto a la presencia de mitosis, infiltrado linfoplasmocitario y células de Kupffer. Por microscopía electrónica se estudiaron el citoplasma y sus organelos en una escala ordinal.

PROCEDIMIENTO QUIRURGICO

Mediante anestesia general con ether se realizó hepatectomía del 40% en todas las ratas y al mismo tiempo se extirparon las gónadas a las de los grupos B y D. Se sacrificaron 2 animales de cada grupo a los 4, 8, 12 y 16 días posthepatectomía y se tomó una muestra de hígado la cual fué tratada inmediatamente con formol para posteriormente ser procesada con tinción de hematoxilina y eosina y tinción de PAS y PAS digerido (en búsqueda de glucógeno) para ser analizada con microscopía de luz. Al mismo tiempo se tomó otra muestra que se trató con glutaraldehído y solución de fosfatos para ser analizada con microscopía electrónica.

Se utilizó la prueba de chi cuadrada y la de Fisher cuando fué necesario.

RESULTADOS

Por microscopía de luz en todas las ratas se apreciaron nódulos de regeneración. No existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de mitosis ($p=0.123$, $x^2=6.400$), infiltrado linfoplasmocitario ($p=0.297$, $x^2=4.392$) y células de Kupffer ($p=0.134$, $x^2=6.215$). (Ver figuras 1 y 2).

Por microscopía electrónica encontramos las mitocondrias dañadas, con pérdida de sus crestas (ver figura 3), aumento del retículo endoplásmico rugoso, en una situación perimitocondrial y material probablemente proteico entre él y las mitocondrias, el retículo endoplásmico liso normal y el citoplasma con una apariencia "esponjosa" (ver figura 4).

DISCUSION

Los cambios histológicos que reportamos en nuestro estudio fueron encontrados después del 4o día en todos los grupos, cuando en el estudio de Anderson y cols. mencionan que la estructura hepática ya ha vuelto a la normalidad después de la resección del mismo tipo. También encontramos daño en las mitocondrias como ellos indican, que no se normalizó ni siquiera en las muestras del día 16. El retículo endoplásmico rugoso se localizó alrededor de ellas cuando se había reportado que lo hacía alrededor del núcleo. Se descartó que fueran fibras de colágena, por tener una apariencia diferente, o glucógeno, por la tinción de PAS y PAS digerido, el material que se encuentra en el citoplasma y que le dá esa imagen descrita como "esponjosa" y desconocemos la naturaleza del mismo.

CONCLUSION

El hecho de que la castración no provoca diferencias entre los resultados obtenidos en los cuatro grupos de estudio sugiere que las hormonas gonadales no tienen efecto en la regeneración hepática después de la hepatectomía del 40%. Hecho que no descarta la posibilidad de que las mismas hormonas producidas en las glándulas suprarrenales pudieran tomar parte en dicho acontecimiento.

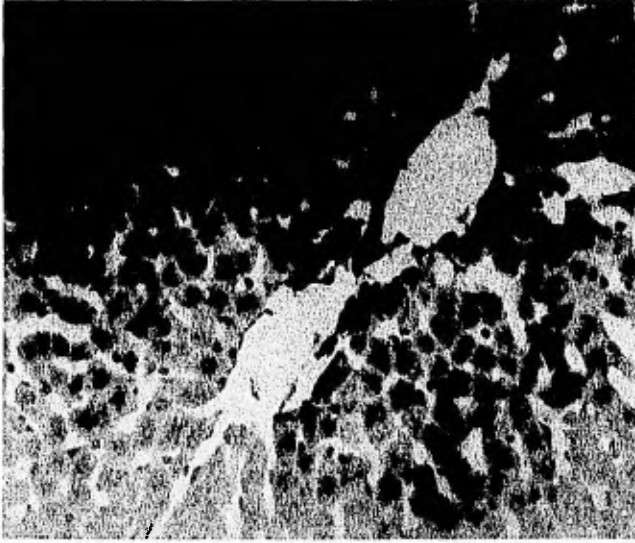


FIG. 1 Por microscopia de luz se aprecian mitosis de hepatocitos e infiltrado linfoplasmocitario.

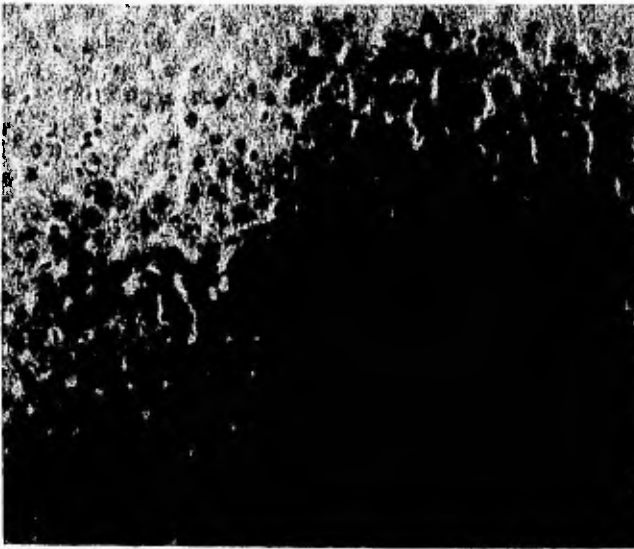


FIG. 2 Células de Kupffer prominentes.

ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

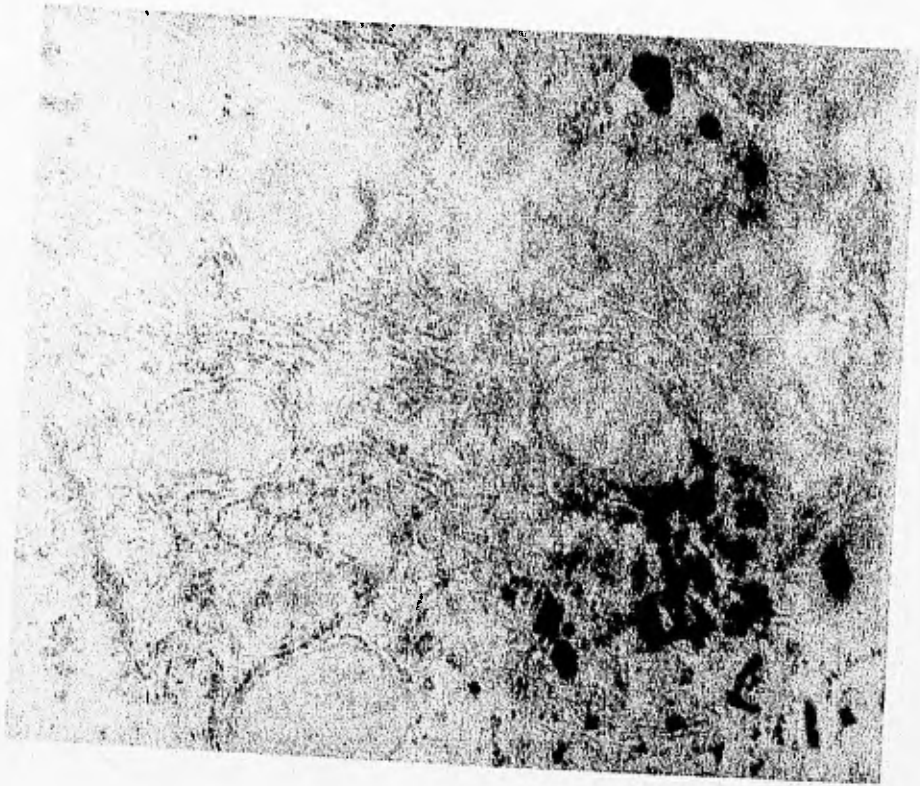


FIG. 3 Daño mitocondrial que se manifiesta con pérdida de sus crestas.

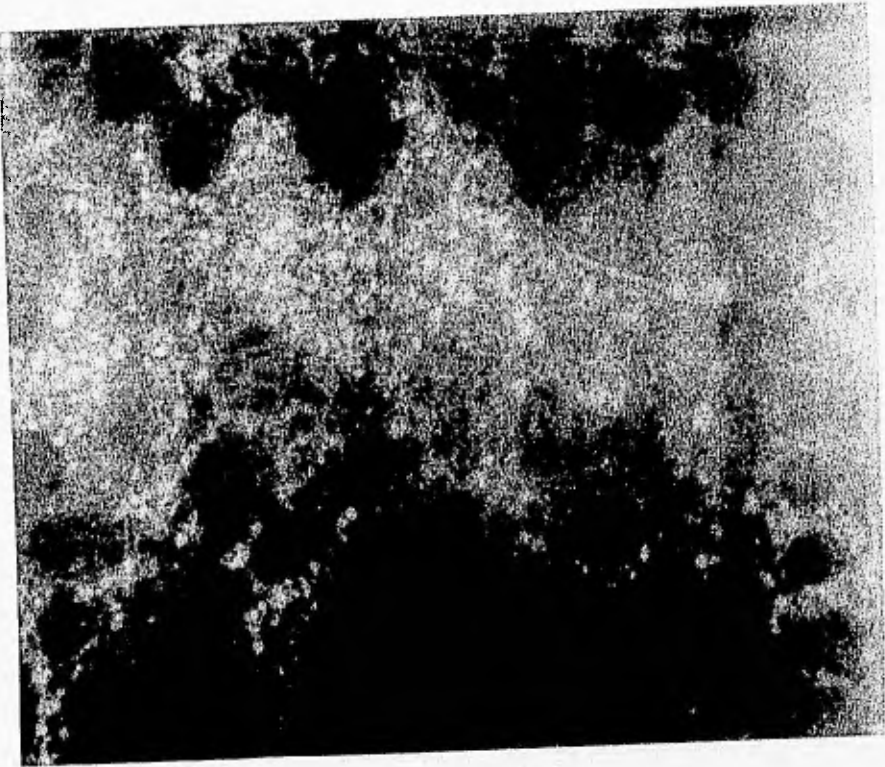


FIG. 4 Situación perimitocondrial del retículo endoplásmico rugoso y aspecto "esponjoso" del citoplasma de los hepatocitos.

REFERENCIAS

1. Baum JK, Holtz F, Bookstein JJ, et al. Possible association between benign hepatomas and oral contraceptives. *Lancet* 1973: 926-9
2. Edmonson, HA., Reynolds, TB., Henderson, B., et al. Regression of liver cell adenomas associated with oral contraceptives. *Ann Intern Med* 1977; 86: 180-2
3. Bühler, H., Pirovino, M., Akovbiantz, A., et al. Regression of liver cell adenoma. *Gastroenterology* 1982. 82 (4): 775 - 782.
4. Green, JRB., Mowat, NAG., Fisher, RA., et al. Plasma oestrogens in men with chronic liver disease. *Gut* 1976. 17: 426 - 430.
5. Chopra, IJ., Tulchinsky, D., Greenway, FL. Estrogen - androgen imbalance in hepatic cirrhosis. *Ann Intern Med* 1973. 79 (2): 198 - 203.
6. Nagasue, N., Ogawa, Y., Yukaya, H., et al. Serum levels of estrogens and testosterone in cirrhotic men with and without hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1985. 88 (3): 768 - 772.
7. Nagasue, N., Ito, A., Yukaya, H., et al. Estrogen receptors in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1986. 57 (1): 87 - 91.

8. Nagasue, N., Ito, A., Yukaya, H., et al. Androgen receptors in hepatocellular carcinoma and surrounding parenchyma. *Gastroenterology* 1985. 89 (3): 643 - 647.

9. Nagasue, N., Kohno, H., Chang, Y., et al. Androgen and estrogen receptors in hepatocellular carcinoma and the surrounding liver in woman. *Cancer* 1989. 63 (1): 112 - 116.

10. Friedman, MA., Demanes, DJ., Hoffman, PG. Hepatomas: Hormone receptors and therapy. *Am J Med* 1982. 73: 362 - 365.

11. Nagasue, N., Chang, Y., Hayashi, T., et al. Androgen receptor in hepatocellular carcinoma as a prognostic factor after hepatic resection. *Ann Surg* 1989. 209 (4): 424 - 427.

12. Nagasue, N., Kohno, H., Chang, Y., et al. Clinicopathologic comparisons between estrogen receptor - positive and - negative hepatocellular carcinomas. *Ann Surg* 1990. 212 (2): 150 - 154.

13. Marti, U., Burwen, SJ., Jones, A. Biological effects of epidermal growth factor, with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: an update. *Hepatology* 1989. 9 (1): 126 - 138.

14. Faust, N. Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Prog Growth Factor Res* 1991. 3 (3): 219 - 234.

15. Zarnegar, R., Michalopoulos, G. Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polipeptide growth factor for hepatocytes. *Cancer Res* 1989. 49 (12): 3314 - 3320.

16. Fleig WE. Liver - specific growth factors. *Scand J Gastroenterol suppl* 1988. 151: 31 - 36.

17. Strain, AJ. Transforming growth factor beta and inhibition of hepatocellular proliferation. Scand J Gastroenterol suppl 1988. 151: 37 - 45.

18. Taper, H. The effect of estradiol - 17- phenylpropionate and estradiol benzoate on N - nitrosomorpholine induced liver carcinogenesis in ovariectomized female rats. Cancer 1978. 42 (2): 462 - 467.

19. Yager, JD., Yager, R. Oral contraceptive steroids as promoters of hepatocarcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. Cancer Res 1980. 40: 3680 - 3685.

20. Harrison, PM., Hughes, RD., Forbes, A. et al. Failure of insuline and glucagon infussion to stimulate liver regeneration in fulminant hepatic failure. J Hepatol 1990. 10: 332 - 336.

21. Michalopoulos, GK. Liver regeneration: Molecular mechanisms of growth control. FASEB J 1990. 4: 176 - 187.

22. Francavilla, A., Cavaler, JS., Makowka, L., et al. Estradiol and testosterone levels in patients undergoing partial hepatectomy. Dig Dis Sci 1989. 34 (6): 818 - 822.

23. Anderson WR, Zieve L, Lindblad S. Ultrastructural study of hepatic regeneration following one lobe, two lobe and subtotal hepatectomy in the rat. Exp Pathol. 38: 61 - 72, 1990.